

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①① N° de publication : **2 813 529**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)
②① N° d'enregistrement national : **01 10239**

⑤① Int Cl⁷ : A 61 K 7/48, A 61 K 7/075, 7/40

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 31.07.01.

③① Priorité : 06.09.00 ES 00002179.

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 08.03.02 Bulletin 02/10.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Ce dernier n'a pas été
établi à la date de publication de la demande.*

⑥① Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : PROVITAL S.A. Sociedad anonima —
ES.

⑦② Inventeur(s) : ARMENGOL SEGURA RICARD et
BENAIGUES MARIA AURORA.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : CABINET JOLLY.

⑤④ COMPOSITION COSMETIQUE ET/OU PHARMACEUTIQUE COMPRENANT UNE METALLOTHIONEINE.

⑤⑦ L'invention concerne une composition cosmétique et/
ou pharmaceutique comprenant des protéines métallothio-
néines (MT). Elle convient à la protection externe contre un
contact par un métal lourd et/ ou un rayonnement ultraviolet.

FR 2 813 529 - A1



**COMPOSITION COSMETIQUE ET/OU PHARMACEUTIQUE
COMPRENANT UNE METALLOTHIONEINE**

Domaine de l'invention

L'invention concerne une composition cosmétique et/ou pharmaceutique comprenant des protéines de type métallothionéine (MT), qui convient à la protection externe contre un contact avec les métaux lourds et/ou les rayonnements ultraviolets.

Etat de la technique

La métallothionéine (MT) représente un ensemble de protéines à faible masse moléculaire, riches en cystéine, à même de lier les ions de métaux monovalents et trivalents tels que les ions des métaux lourds du groupe IIb. Elles sont entre autres largement distribuées entre les espèces et plantes eucaryotes (Hamer DH, Ann. Rev. Biochem, 55:913-951, 1986 ; Dunn et al., Pro Soc Exp Biol Med 185:107-119, 1987).

La demande ES 2087652 T3 (équivalente à EP 557042B) décrit l'utilisation d'une MT dans une préparation cosmétique ou pharmaceutique pour la protection externe des tissus humains ou animaux contre un contact par des métaux lourds. La MT à utiliser se présente de préférence sous sa forme apoprotéine, c'est-à-dire sous une forme dans laquelle la MT est dépourvue d'ions de métaux lourds liés (voir colonne 4, lignes 12-17).

Les articles Hanada et al., Photodermal Photoimmunol Photomed 9:209-213 1992/1993 ; Hanada et al, Journal Investigative Dermatology III(4):582-585, 1998) exposent que la MT joue un rôle dans la protection de la peau contre le rayonnement ultraviolet du soleil. Dans le dernier article ci-dessus, ceci est démontré par une comparaison de souris sans MT, présentant une déficience en gènes de la MT, à des souris normales. Ce fait est en outre étayé par Anstey et al. (Journal Pathology 178:84-88, 1996), qui présente une augmentation de la MT dans le derme de la peau humaine exposée aux rayonnements UV.

CN 1092974 A décrit une composition cosmétique assurant une protection contre le rayonnement UV, qui contient de la MT, dans laquelle la majorité des protéines MT sont sous leur forme apoprotéine libre (c'est-à-dire sans ions de métaux lourds liés).

JP 06009362 A décrit aussi une composition cosmétique contre

les rayonnements UV, comprenant une MT, dans laquelle la majorité des protéines MT sont sous leur forme apoprotéine libre, et dans laquelle des ions Zn sont ajoutés à la composition, c'est-à-dire que les ions Zn ne sont pas directement liés à la MT, mais représentent une
5 partie distincte de la solution de la composition.

Le problème à résoudre par la présente invention est de fournir une composition cosmétique et/ou pharmaceutique améliorée pour la protection externe des tissus humains ou animaux (a) contre un contact par des métaux lourds et/ou (b) contre les rayonnements
10 ultraviolets.

La solution consiste à utiliser, dans la composition, des protéines métallothionéines (MT) produites par recombinaison, des ions Zn étant spécifiquement ajoutés pendant l'opération de production de la Mt par recombinaison, de sorte que l'opération de recombinaison conduit à des protéines MT, dans lesquelles la majorité
15 des protéines MT comprennent un groupement prosthétique à ion Zn lié.

En conséquence, un premier aspect de l'invention concerne une composition cosmétique et/ou pharmaceutique sous forme d'un gel, d'une crème, d'un onguent, d'un savon ou d'une lotion corporelle, pour la protection externe des tissus humains ou animaux (a) contre un contact par des métaux lourds et/ou (b) contre un rayonnement ultraviolet, caractérisée en ce qu'elle comprend des protéines métallothionéines (MT), où la majorité des protéines MT comprennent
20 un groupement prosthétique à ion Zn lié, et que l'on peut obtenir par un procédé comprenant les étapes suivantes :

(a) construction, par des techniques de recombinaison d'ADN, d'une cellule de production comprenant un produit de synthèse d'ADN qui comprend une séquence d'ADN codant pour une MT présentant un intérêt et qui est capable de produire la MT ;
30

(b) culture de la cellule de production dans un milieu approprié, pendant un laps de temps approprié, dans des conditions appropriées, dans lesquelles la cellule produit la MT, et où le milieu comprend des ions Zn en une quantité molaire suffisante pour permettre que la majorité des protéines MT produites comprennent un groupement prosthétique à ion Zn lié, et que le milieu ne comprend essentiellement pas d'ions Pb, Cd, Cu, Ag, Hg ou Bi ;
35

(c) isolement des protéines MT produites, la majorité des protéines MT comprenant un groupe prosthétique à ion Zn lié.

Les protéines MT sont des protéines ayant une forte tendance à l'oxydation, quand elles se présentent sous leur forme apoprotéine, c'est à dire sans groupement prosthétique à ion d'un métal lourd lié. Au contraire, les MT comportant un tel groupement prosthétique à ion d'un métal lourd lié sont très stables et peuvent être efficacement utilisées pour un traitement extra-cellulaire.

En conséquence, un avantage par rapport aux compositions de la technique antérieure, dans lesquelles la plus grande partie des protéines MT se présentent sous leur forme apoprotéine, réside dans le fait que les protéines MT d'une composition telle que décrite dans l'invention se présentent sous une forme beaucoup plus stable. Cela est particulièrement vrai quand la composition doit être utilisée pour une protection externe. Ici, la composition est placée par exemple directement sur la peau, et les protéines MT sont donc dans un environnement extra-cellulaire, ce qui rend la forme apoprotéine de la MT très sensible à l'oxydation.

Les protéines MT ont des affinités différentes pour différents métaux lourds. L'échelle de cette affinité est la suivante : $Zn < Pb < Cd < Cu < Ag < Hg < Bi$. En conséquence, un complexe MT-Zn va en présence d'ions Cd libérer le Zn et le remplacer par Cd pour donner un complexe Mt-Cd. On sait que tous les métaux lourds Pb, Cd, Cu, Ag, Hg et Bi sont présents dans l'atmosphère, et on sait qu'ils sont nocifs pour l'homme et l'animal. Au contraire, Zn est l'un des éléments les plus abondants dans l'organisme, et joue un rôle avantageux fondamental pour ce dernier.

Si les protéines MT sont purifiées directement à partir d'une plante (par exemple comme suggéré dans la demande EP 242799 A2) ou d'un tissu provenant d'autres sources naturelles, telles que les animaux et les microorganismes (comme suggéré par exemple dans ES 2087652 T3, colonne 2, lignes 53-59), on obtiendra un mélange de protéines MT, en ce sens qu'un certain nombre de ces dernières vont se présenter sous leur forme apoprotéine, tandis que d'autres vont avoir des ions Pb, Cd, Cu, Ag, Hg ou Bi liés, certaines d'entre elles pouvant avoir des ions Zn liés. La majorité de ces protéines MT purifiées ne va manifestement pas avoir d'ions Zn liés, entre autres en

raison de l'échelle d'affinité présentée ci-dessus.

En conséquence, un avantage par rapport aux compositions de la technique antérieure, qui comprennent des protéines MT purifiées directement à partir d'une source naturelle, est que les protéines MT d'une composition telle que décrite dans l'invention peuvent efficacement jouer le rôle d'une source de Zn pour l'organisme, c'est-à-dire que les protéines MT vont libérer le Zn pendant la capture des métaux lourds nocifs Pb, Cd, Cu, Ag, Hg et Bi (voir l'échelle d'affinité ci-dessus).

Dans les compositions cosmétiques dans lesquelles les ions Zn représentent une partie distincte de la solution de la composition, le pH doit être maintenu à une valeur de pH acide relativement fort, pour maintenir les ions en solution. Ce n'est pas le cas avec une composition telle que décrite dans l'invention, qui peut parfaitement avoir un pH proche de la neutralité, c'est-à-dire un pH de 5 à 6,5 ou de préférence de 5,5 à 6. Il est naturellement avantageux que, par exemple, une composition cosmétique ait un pH proche du neutre.

Dans un deuxième aspect, l'invention concerne l'utilisation de la composition telle que décrite, pour la protection cosmétique externe de tissus humains ou animaux contre (a) un contact par des métaux lourds et/ou (b) un rayonnement UV, par administration topique de la composition sur les tissus.

L'invention concerne en outre un procédé de production de la composition décrite dans l'invention, et l'utilisation de protéines métallothionéines (MT), ou la majorité des protéines MT comprennent un groupe prosthétique à ion Zn lié, et que l'on peut obtenir par un procédé correspondant au premier aspect de l'invention, pour préparer une composition cosmétique et/ou pharmaceutique sous forme d'un gel, d'une crème, d'un onguent, d'un savon ou d'une lotion corporelle pour protection externe de tissus humains ou animaux (a) contre un contact par des métaux lourds et/ou (b) des rayonnements UV.

Un dernier aspect concerne une protéine MT isolée, telle que celle qui peut être obtenue par une technique de recombinaison destinée à préparer la MT telle que décrite dans l'invention.

Définitions :

Avant d'étudier des formes de réalisation détaillées de l'invention, une définition va être fournie de termes spécifiques

concernant les principaux aspects de l'invention.

L'expression "composition cosmétique et/ou pharmaceutique" désigne dans l'invention une composition pouvant être utilisée pour la protection externe de tissus humains ou animaux (a) contre un contact par des métaux lourds et/ou (b) des rayonnements ultraviolets, c'est-à-dire qu'elle doit pouvoir être appliquée sur les tissus externes, tels par exemple que la peau. L'homme de métier connaît les ingrédients convenant à cette fin.

L'expression "métallothionéines (MT)" : les MT sont isolées de tissus animaux, de plantes et de micro-organismes. Ce sont des protéines non globulaires, situées en position intracellulaire, essentiellement dans le cytoplasme, et elles ont été isolées chez les mammifères en de très grandes quantités, à partir des tissus parenchymateux du foie, des reins et des intestins.

La classification et la nomenclature des MT dont il est question dans l'invention est celle qui est recommandée par "The Committee on the Nomenclature of Metallothionein", First International Meeting on Metallothioneins and other Low Molecular Weight Metal-Binding Proteins (Comité de Nomenclature des Métallothionéines, Première Rencontre Internationale sur les Métallothionéines et d'autres Protéines à Faible Masse Moléculaire se liant à des Métaux), Zurich, Juillet 1978.

On reconnaît actuellement trois classes de MT, comme suit :

Classe I

Dans cette classe sont inclus tous les polypeptides dont la structure primaire est reliée à la MT du rein du cheval. Ce matériau est caractérisé par les particularités suivantes :

- (i) masse moléculaire 6000-7000 ;
- (ii) haute teneur en métaux ;
- (iii) composition caractéristique en acides aminés (haute teneur en cystéine, aucun acide aminé aromatique) ;
- (iv) distribution unique en son genre de résidus cystéine dans la séquence d'acides aminés ;
- (v) particularités spectroscopiques caractéristiques des complexes métal-thiolate et des amas métal-thiolate.

Classe II

Cette classe comprend les formes présentant seulement une

correspondance légère, ou sans évolution, avec les formes mammifères, pour ce qui concerne la structure primaire. Des exemples en sont les MT provenant de l'oursin et de *N. crassa*. Cependant, elles ont la même aptitude que les MT de la classe I à former des complexes métal-thiolate et des amas métal-thiolate.

Classe III

Cette classe comprend des oligo - et polypeptides atypiques homologues de structure générale $(\text{Glu-Cys})_n\text{X}$ où n vaut de 2 à 8 et X est un acide aminé tel que la glycine ou la bêta alanine. On les appelle souvent des phytochélatines, et ils ont été isolés de tissus végétaux et fongiques.

Ces MT peuvent se présenter sous forme de structures oligomères constituées de deux chaînes ou plus, ayant une différence de masse moléculaire de 500 à 2000 daltons, liées par l'intermédiaire de ponts métal-thiolate et/ou par des liaisons disulfures.

Ainsi, on peut voir que le terme «métallothionéine» englobe une très large variété de protéines ayant des structures et des tailles différentes, mais partageant une aptitude commune à lier les ions métalliques dans les complexes avec les chaînes latérales de la cystéine, pour former des amas métal-thiolate discrets. Les séquences d'acides aminés de métallothionéines typiques des Classes I, II et III, sont consignées dans le Tableau I ci-dessous.

Tableau I : Séquences d'acides aminés de certaines métallothionéines des Classes I, II et III

Organisme	Séquence d'acides aminés
MT-II humaine (classe I) Nom de l'entrée dans la base de données SWISS-PROT : « <u>MT2 HUMAN</u> »	-Ac-MDPNCSAA GDSCTCAGS CKCKE CKCTSCCKKS CCSCCPVGCA KCA QGCICKGASDK CSCCA
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (classe II)	QNEGHECQCQCGSCKNNEQCQK SCSCPTGCN SDDKCPCGNKSEET
<i>Rauvolfia serpentina</i>	KKSCCSGK (glu-Cys) _n = Gly _n = 4,8

Selon l'invention, on peut utiliser des polypeptides ayant les caractéristiques fonctionnelles des métallothionéines décrites ci-dessus. Ils peuvent être caractérisés en ce qu'ils ont des séquences spécifiques à l'intérieur de la chaîne peptidique, tels que Cys-Cys, Cys-X-Cys et Cys-X-Y-Cys, dans lesquelles X et Y sont des résidus autres que Cys.

Ainsi, la MT utilisée selon l'invention peut être une métallothionéine de la classe I et/ou de la classe II et/ou de la classe III, selon les définitions données par la convention internationale sur la nomenclature.

A la date de dépôt, de nombreuses séquences appropriées de protéines MT étaient disponibles dans la base de données publiques SWISS-PROT. Entre autres, il s'agit des suivantes (les noms d'entrée de SWISS-PROT sont soulignés) : MT1A BOVIN METALLOTHIONEIN-1A (MT-1A) (MTC). {GENE :MT1A OR MT-1A} - Bos taurus (Boeuf), Ovis aries (Mouton) ; MT1A HORSE METALLOTHIONEIN-1A (MT-1A). Equus caballus (Cheval) : MT1A HUMAN METALLOTHIONEIN-1A (MT-1A). {GENE:MT1A} - Homo sapiens (Humain) ; MT1A RABIT METALLOTHIONEIN-1A (MT-1A). - Oryctolagus cuniculus (Lapin); MT2 RABIT METALLOTHIONEIN-IIA (MT-2A). - Oryctolagus cuniculus (Lapin) ; et MT2 HUMAN METALLOTHIONEIN-II (MT-II).{GENE: MT2A OR MT2} - Homo sapiens (Humain).

L'expression «la majorité des protéines MT comprennent un groupement prosthétique à ion Zn lié» signifie qu'au moins 60 % du total des protéines MT produites par recombinaison et incorporées dans la composition cosmétique et/ou pharmaceutique comprennent un groupement prosthétique à ion Zn lié ; de préférence, au moins 75 % du total des protéines MT produites par recombinaison incorporées dans la composition cosmétique et/ou pharmaceutique comprennent un groupement prosthétique à ion Zn lié, plus préférablement au moins 90 % du total des protéines MT produites par recombinaison et incorporées dans la composition cosmétique et/ou pharmaceutique comprennent un groupement prosthétique à ion Zn lié, et encore plus préférablement, sensiblement toutes les protéines MT produites par recombinaison et incorporées dans la composition cosmétique et/ou pharmaceutique comprennent un groupement prosthétique à ion Zn lié.

Les nombres mentionnés ci-dessus doivent être mesurés au moment où les protéines MT sont incorporées dans la composition cosmétique et/ou pharmaceutique. En raison de la grande stabilité des complexes MT-Zn, le rapport va se maintenir essentiellement inchangé dans les conditions normales de stockage de cette composition cosmétique et/ou pharmaceutique. Cependant, le rapport va bien entendu changer quand la composition est utilisée comme décrit dans l'invention, du fait par exemple que le complexe MT-Zn est transformé en un complexe par exemple MT-Pb.

La méthode à utiliser pour vérifier si une protéine MT comprend un groupement prosthétique à ion Zn est de préférence la méthode de la spectrométrie d'émission par plasma à couplage inductif (ICPAES). Voir "Bongers J. et al ; Micromolar protein concentrations ADN metalloprotein stoichiometries obtained by inductively-coupled-plasma-emission-spectrometry determination of sulphur ; Analyt. Chem. 60:2683-2686 (1988)" pour plus de détails concernant la méthode ICPAES.

L'Expression "groupement prosthétique" désigne un groupe chimique non protéique (par exemple, un atome métallique) lié à une protéine, comme c'est le cas avec de nombreuses protéines formant habituellement une partie du site actif, et essentiel pour l'activité biologique.

Le terme "apoprotéine" désigne la partie protéique de la protéine restant après élimination du groupement prosthétique.

L'expression "techniques de recombinaison d'ADN" de l'étape (a) du premier aspect désigne des techniques de génétique moléculaire, comprenant l'analyse par les enzymes de restriction, le clonage de l'ADN, l'hybridation de l'ADN, l'amplification PCR, le séquençage de l'ADN, etc., qui sont utilisés pour produire et exploiter des ADN recombinants.

L'expression "le milieu comprend des ions Zn en une quantité molaire suffisante pour garantir que la majorité des protéines MT produites comprennent un groupement prosthétique à ion Zn lié" de l'étape (b) du premier aspect doit être comprise comme signifiant que le milieu comprend une quantité d'ions Zn suffisante pour arriver à l'effet selon lequel la majorité des protéines MT produites vont comprendre un groupement prosthétique à ion Zn lié. L'homme de métier sait

comment ajuster la quantité d'ions Zn sur la base de la quantité de protéines MT produites à l'intérieur de la cellule de production choisie. D'une manière générale, la quantité molaire des ions Zn doit de préférence être au moins proche de la quantité molaire de la MT produite, plus préférentiellement la quantité molaire des ions Zn doit être au moins trois fois supérieure à la quantité molaire de la MT produite et, de façon plus préférée, la quantité molaire des ions Zn doit être au moins cent fois supérieure à la quantité molaire de la MT produite. Les ions Zn peuvent de préférence être ajoutés au milieu sous forme par exemple de ZnCl_2 , de ZnI_2 ou de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, ou de composés chimiques analogues.

L'expression «le milieu ne comprend essentiellement pas d'ions Pb, Cd, Cu, Ag, Hg ou Bi» de l'étape (b) du premier aspect doit être comprise en relation avec l'expression immédiatement ci-dessus, en ce sens que le milieu peut comprendre une petite quantité de ces ions, mais ils ne doivent pas être présents en une quantité qui va affecter le résultat recherché global, selon lequel la majorité des protéines MT produites doivent comprendre un groupement prosthétique à ion Zn lié. L'homme de métier, en se fondant sur ses connaissances générales, sait comment effectuer l'ajustement. De préférence, aucun des ions Pb, Cd, Cu, Ag, Hg ou Bi ne doit être présent dans le milieu en une quantité molaire supérieure à 10 % de la quantité molaire de la MT produite, plus préférentiellement aucun des ions Pb, Cd, Cu, Ag, Hg ou Bi ne doit être présent dans le milieu en une quantité molaire supérieure à 1 % de la quantité molaire de la MT produite, et encore plus préférentiellement aucun des ions Pb, Cd, Cu, Ag, Hg ou Bi ne doit être présent dans le milieu en une quantité molaire dépassant 0,1 % de la quantité molaire de la MT produite.

L'expression «isolement des protéines MT produites» de l'étape (c) du premier aspect signifie que les protéines MT sont de préférence isolées jusqu'à une pureté d'au moins environ 10 %, plus préférentiellement jusqu'à une pureté d'au moins environ 40 % et de façon encore plus préférée jusqu'à une pureté d'environ 95 %, telle que déterminée par SDS-PAGE. L'expression «isolement des protéines MT produites» peut s'exprimer aussi par «purification des protéines MT produites».

Des formes de mise en œuvre de la présente invention sont

décrites ci-dessous, sous forme d'exemple(s) seulement.

Description détaillée de l'invention :

Composition cosmétique et/ou pharmaceutique :

La composition doit pouvoir être utilisée pour la protection externe des tissus humains ou animaux (a) contre un contact par un métal lourd et/ou (b) contre un rayonnement ultraviolet, c'est-à-dire qu'elle doit pouvoir être avantageusement placée sur les tissus externes, tels que la peau. L'homme de métier sait d'une manière générale incorporer les ingrédients appropriés à cette fin.

Il est préférable que les compositions de l'invention soient formulées sous forme de gels, de crèmes, de pommades ou de lotions pour le corps. En outre, il est envisagé que les compositions de l'invention soient formulées de façon à être appliquées sur les parties exposées du corps sous forme d'une crème barrière ou d'un fond de teint, qui de préférence peut comprendre un colorant et/ou un parfum inertes d'un point de vue dermatologique.

On préfère tout spécialement que les compositions soient formulées sous forme d'un mélange filmogène résistant à l'eau, qui peut comprendre par exemple des huiles, des cires, des huiles de silicone ou d'autres matériaux excipients hydrophobes inertes analogues. Il est naturellement souhaitable que ces matériaux n'interagissent pas avec les groupes sulfhydrile des protéines MT. Les compositions sont de préférence résistantes à l'eau et sont de préférence capables de rester sur la peau tout au long des activités normales du jour, tout en pouvant être éliminées simplement par lavage avec un détergent, tel qu'un savon.

Des formes de réalisation de l'invention concernent :

- la composition cosmétique et/ou pharmaceutique telle que décrite ici, qui comprend en outre un excipient inerte d'un point de vue physiologique et convenant à une administration topique ;

- la composition cosmétique et/ou pharmaceutique telle que décrite ici, cette composition comprenant de 0,0000001 à 10 % (en poids) du polypeptide MT, de préférence de 0,000001 à 5 % en poids du polypeptide MT, plus préférablement de 0,000005 à 1 % (en poids) du polypeptide MT, et encore plus préférablement de 0,000005 à 0,0005 % (en poids) du polypeptide MT ; et/ou

- la composition cosmétique et/ou pharmaceutique telle que

décrite ici, la composition étant un gel pour le bain, un savon liquide, un shampoing, un shampoing conditionnant, un tonique capillaire, un baume après rasage, une lotion solaire (de préférence de protection moyenne), un tonique pour le visage, une lotion humectante, un gel-crème, une crème de maquillage, un fond de teint ou un tonique pour la peau.

Un procédé de technique par recombinaison, permettant d'obtenir un échantillon de protéines métallothionéines (MT), où la majorité des protéines MT comprennent un groupement prosthétique à ion Zn lié, comprend :

Etape (a) : construction, par des techniques de recombinaison d'ADN, d'une cellule de production comprenant un produit de synthèse d'ADN qui comprend une séquence d'ADN codant pour une MT présentant un intérêt et qui est capable de produire la MT.

Cellule de production :

L'homme de métier a à sa disposition de nombreuses cellules de production convenant en particulier à l'expression hétérologue d'un gène présentant un intérêt. On peut utiliser dans l'invention l'une quelconque d'entre elles. La cellule de production peut être par exemple un microorganisme monocellulaire, par exemple un procaryote, ou un microorganisme non-monocellulaire, par exemple un eucaryote.

A titre d'exemples préférés de cellules eucaryotes, on peut citer les cellules fongiques filamenteuses. Les «champignons filamenteux» comprennent toutes les formes filamenteuse des subdivisions Eumycota et Oomycota (telles que définies par Hawksworth et al., 1995, ci-dessus). Dans une forme de réalisation particulièrement préférée, la cellule fongique filamenteuse est une cellule de l'une des espèces suivantes, mais sans limitation, Acremonium, Aspergillus, Fusarium, Humicola, Mucor, Myceliophthora, Neurospora, Penicillium, Thielavia, Tolypocladium et Trichoderma, ou un téléomorphe ou synonyme de ces derniers. En particulier, la cellule peut appartenir à une espèce de Trichoderma, de préférence Trichoderma harzianum ou Trichoderma reesei, ou à une espèce d'Aspergillus, tout spécialement Aspergillus oryzae ou Aspergillus niger, ou à une espèce de Fusarium, tout spécialement un Fusarium sp. ayant la caractéristique d'identification Fusarium ATCC 20334, comme décrit plus en détail

dans la demande PCT/US/95/07743.

Les cellules fongiques peuvent être transformées par un processus impliquant la formation d'un protoplaste, la transformation des protoplastes, et la régénération de la paroi cellulaire d'une manière connue en soi. Des modes opératoires convenant à la transformation de cellules hôtes *Aspergillus* sont décrites dans EP 238 023 et Yelton et al., 1984, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 81:1470-1474. Un procédé convenant à la transformation de l'espèce *fusarium* est décrit par Malardier et al., 1989, *Gene* 78:147-156, ou dans la demande de brevet US simultanément pendante déposée sous le N° de série 08/269 449.

Une autre cellule de production eucaryote préférée est constituée d'une cellule de levure, telle que *Saccharomyces cerevisiae*. Voir «Becker et Guarente, dans Abelson J.N. et Simon M.I., eds, *Guide to Yeast Genetics ADN Molecular Biology, Methods in Enzymology*, volume 194, page 182-187, Academic Press. Inc., New York ; Ito et al., 1983, pour une description plus poussée de cellules de levure appropriées.

Parmi les cellules procaryotes préférées, on peut citer une cellule provenant de souches gramme positives, notamment les espèces de *Bacillus* telles que *Bacillus subtilis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus brevis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus circulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus thurigiensis*, ou en particulier *Bacillus licheniformis*. Voir «Current Protocols in Molecular Biology, Hohn Wiley ADN Sons, Inc., NY, 1987 ; et *Bacillus subtilis ADN Other Gram-Positive Bacteria*, Sonensheim et al., 1993, American Society for Microbiology, Washington D.C., pour une description plus poussée de cellules appropriées de *Bacillus*.

La cellule de production procaryote la plus préférée est une cellule de *E. coli*, et une forme de réalisation de l'invention concerne la composition cosmétique et/ou pharmaceutique telle que décrite, dans laquelle la cellule de production est une cellule de *E. coli*, et l'isolement de la MT produite est effectué par séparation des cellules de *E. coli* du milieu, suivie d'une lyse des cellules et d'un isolement des protéines MT comprises dans le lysat cellulaire. Voir «Hannig G. et Makrides S., *Strategies for optimizing heterologous protein expression in E. coli*,

Trends in Biotechnology, Février 1998, 16, page 54-60», pour plus de détails concernant E. coli en tant que cellule de production.

Produit de synthèse d'ADN (ou vecteur d'expression) qui comprend une séquence d'ADN codant pour une MT présentant un intérêt :

Un produit de synthèse d'ADN (ou vecteur d'expression) peut être par exemple un vecteur tel qu'un plasmide, qui après transformation dans la cellule de production est maintenu en tant que vecteur extra-chromosomique à auto-réplication, ou encore le vecteur s'intègre lui-même dans le chromosome de la cellule de production pour que le vecteur soit maintenu en tant qu'intégrant chromosomique. L'homme de métier dispose de nombreux systèmes pour introduire un gène présentant un intérêt dans une cellule de production, et référence est faite aux documents ci-dessus, en liaison avec les cellules de production préférées spécifiques, pour identifier les systèmes convenant à la cellule de production spécifiquement choisie.

La cellule de production doit être capable de produire la MT.

Le fait que la cellule synthétisée doive être capable de produire la MT exige généralement que la cellule de production comprenne des éléments tels qu'un promoteur approprié, un terminateur de transcription, des éléments affectant l'initiation de la traduction et des terminateurs de traduction. Tous ces éléments sont bien connus de l'homme de métier, et ce dernier dispose en outre d'éléments supplémentaires correspondant à la cellule de production choisie. Une fois de plus, référence est faite aux documents ci-dessus, en liaison avec les cellules de production préférées particulières, dans le but d'identifier les systèmes spécifiques convenant à la cellule de production spécifique choisie.

Etape (b) : culture de la cellule de production dans un milieu approprié, pendant un laps de temps approprié, dans des conditions appropriées dans lesquelles la cellule produit la MT :

L'homme de métier dispose de nombreux milieux appropriés, et il connaît les paramètres temps, température, etc., qui garantissent le succès de la production de la protéine MT. Référence est faite aux documents ci-dessus en liaison avec les cellules de production préférées spécifiques, dans le but d'identifier les conditions de culture et les milieux appropriés et les milieux particuliers convenant à la

cellule de production spécifique choisie.

Etape (c) : isolement des protéines MT produites, la majorité des protéines MT comprenant un groupement prosthétique à ions Zn liés.

5 L'homme de métier dispose d'un certain nombre de stratégies pour isoler les protéines MT, et le choix d'une protéine MT appropriée particulière est une affaire de routine et peut dépendre de certains facteurs, notamment du sort de la MT, selon qu'elle est sécrétée dans le milieu ou maintenue en situation intracellulaire dans la cellule de production.

10 On peut citer à titre d'exemples d'étapes appropriés d'isolement la CLHP, la CLHF, la chromatographie en phase liquide haute performance en phase inversée et la chromatographie d'affinité. Voir par exemple «Affinity Chromatography: Principles & Methods, Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden, 1988» pour plus de
15 détails.

Induction de la transcription de la séquence codante de la MT, immédiatement suivie de l'addition d'ions Zn au milieu.

20 Dans une forme de réalisation préférée de l'invention, le produit de synthèse d'ADN de l'étape (a) du premier aspect n'est capable que de transcrire la séquence d'ADN codant pour la MT après une induction appropriée, les ions zinc étant ajoutés ensuite au milieu avant ou immédiatement après induction du produit de synthèse d'ADN pour transcrire la séquence d'ADN.

25 De préférence, les ions Zn sont ajoutés immédiatement après que le produit de synthèse d'ADN a été induit pour transcrire la séquence d'ADN. Le terme «immédiatement» correspond de préférence à un maximum de 45 minutes après l'induction, plus préféablement à un maximum de 20 minutes après l'induction et encore plus préféablement à un maximum de 5 minutes après l'induction.

30 Un exemple préféré est celui où la cellule de production est une cellule de E. coli, et où la séquence d'ADN codant pour la MT est sous le contrôle d'un promoteur tac, inductible par l'IPTG, l'induction étant effectuée par addition d'IPTG au milieu. Cet exemple préféré est décrit plus en détail dans les exemples de travail de la présente description
35 (voir ci-dessous).

D'autres systèmes promoteurs inductibles appropriés, spécifiques d'une cellule de production particulière de choix, sont bien

connus de l'homme de métier, et référence est faite aux documents ci-dessus, en liaison avec les cellules de production préférées spécifiques, pour identifier des systèmes inductibles particuliers convenant à une cellule de production spécifique.

5 Utilisation d'un polypeptide de fusion comprenant la MT et une séquence polypeptidique supplémentaire capable de stabiliser la MT

10 Dans une forme de réalisation préférée, le produit de synthèse d'ADN de l'étape (a) du premier aspect comprend une séquence d'ADN codant pour un polypeptide de fusion de la MT et une séquence polypeptidique supplémentaire capable de stabiliser la MT pendant l'étape de culture (b) du premier aspect.

15 La raison en est que la protéine MT peut être présente sous sa forme apoprotéine pendant la production par recombinaison, de sorte que, comme on l'a dit ci-dessus, la protéine MT peut être relativement instable. La technique antérieure décrit un certain nombre de ces polypeptides stabilisants supplémentaires appropriés, tels que la protéine A staphylococcique, la bêta-galactosidase, la protéine de liaison du maltose, ou la thiorédoxine. On les préfère en particulier quand la cellule de production utilisée est E. coli. Pour ce qui concerne
20 d'autres polypeptides stabilisants supplémentaires appropriés, référence est faite à «Hannig G. et Makrides S., Strategies for optimizing heterologous protein expression in E. coli, Trends in Biotechnology, Février 1998, 16, pages 54-60» (voir en particulier le tableau 2).

25 Cette stabilité de la MT pendant l'étape de culture (b) doit être mesurée par rapport à la différence entre la MT produite avec la séquence stabilisante supplémentaire et sans cette séquence. Dans les deux cas, il convient d'utiliser le même procédé de production, c'est-à-dire la même cellule, le même promoteur, les mêmes conditions de
30 fermentation, le même protocole d'isolement, etc. Puis on compare les quantités finales de la MT isolée obtenues. De préférence, la quantité de la MT isolée finalement, quand on utilise un produit de fusion, est au moins deux fois plus grande que celle correspondant à la non-utilisation d'un polypeptide stabilisant supplémentaire, et plus
35 particulièrement la quantité de MT isolée finalement lors de l'utilisation d'un produit de fusion est au moins cinq fois supérieure à ce qui se passe lors d'une non-utilisation d'un polypeptide stabilisant

supplémentaire.

De préférence, la séquence polypeptidique supplémentaire est capable de stabiliser la métallothionéine sous sa forme apoprotéine.

En outre, on préfère que la séquence polypeptidique supplémentaire stabilise la MT, car elle est capable de diminuer la vitesse d'oxydation des groupes thiol (-SH) de cystéine de la MT, ce qui diminue la formation de ponts disulfure à l'intérieur de la MT.

Le polypeptide supplémentaire fusionné à la MT peut être éliminé de la MT après l'étape d'isolement (c) du premier aspect. Dans l'état actuel de la technique, on peut pour cela utiliser de nombreuses techniques. Un exemple en est par exemple quand le produit de fusion ainsi obtenu comprend un site de clivage par une protéase spécifique intercalaire. Le produit de synthèse d'ADN utilisé dans un exemple de travail de l'invention (pGEX-4T1, voir ci-dessous) est un exemple d'une telle situation. Dans cet exemple, le produit de fusion isolé est le MT-site de clivage par le facteur X_a -GST (le polypeptide stabilisant supplémentaire). Par clivage avec le facteur X_a , le polypeptide supplémentaire qui s'est fusionné à la MT est éliminé de la MT.

De préférence, le polypeptide supplémentaire fusionné à la MT est lui aussi capable de stabiliser la MT isolée finale, de sorte que le polypeptide de fusion isolé final comprenant le polypeptide stabilisant supplémentaire est plus stable que la MT correspondante ne possédant pas le polypeptide stabilisant supplémentaire.

Cette stabilité supplémentaire de la MT isolée finale doit être mesurée par la différence de stabilité entre une protéine MT isolée avec et sans la séquence stabilisante supplémentaire. De préférence, on procède pour cela en introduisant la même quantité de "MT seule" et de "MT fusionnée à la séquence stabilisante supplémentaire" dans deux tubes à essais différents d'un tampon tris-HCl 50 mM, pH 7,0, 25°C. Les échantillons sont maintenus pendant 4 heures, et on mesure pour les deux la quantité de protéines MT qui ont conservé leur groupement prosthétique à ion Zn lié. L'aptitude à conserver le groupement prosthétique à ion Zn traduit la stabilité de la MT, car elle est relativement stable sous sa forme apoprotéine (voir ci-dessus). De préférence, un échantillon de MT à laquelle est fusionné le polypeptide supplémentaire a au moins deux fois plus de protéines MT qui ont conservé leur groupement prosthétique à ion Zn lié qu'un échantillon

de MT sans la séquence stabilisante supplémentaire, et plus
préférentiellement un échantillon de MT à laquelle est fusionné le
polypeptide supplémentaire a au moins quatre fois plus de protéines
MT ayant conservé leur groupement prosthétique à ion Zn lié qu'un
échantillon de MT sans polypeptide supplémentaire fusionné.

De préférence, la MT est fusionnée à la séquence polypeptidique
supplémentaire, de sorte que le polypeptide de fusion possède le
polypeptide supplémentaire au niveau du site N-terminal, et la MT au
niveau du site C-terminal du produit de fusion.

Tout spécialement, la séquence polypeptidique supplémentaire
capable de stabiliser la MT comprend une séquence de l'enzyme
glutathion-S-transférase (GST). L'enzyme GST porte le numéro 2.5.1.18
de la classification des enzymes (E.C.), et catalyse la réaction «RX +
glutathion \rightleftharpoons HX + R-S-G».

A la date du dépôt, la base de données «enzymes» de SWISS-
PROT, disponible pour le public, comprenait un certain nombre de
séquences appropriées d'enzymes GST, telles que (les noms d'entrée de
SWISS-PROT sont soulignés) : Q99735, GST2 HUMAN ; P46434, GT1
ONCVO : P30112, GT26 FASHE ; P15964, GT26 SCHMA ; Q28035,
GTA1 BOVIN ; Q09596, GTA1 CAEEL ; Q08392, GTA1 CHICK ;
P08263, GTA1 HUMAN ; et P13745, GTA1 MOUSE.

La GST préférée est une enzyme GST de *Schistosoma japonicum*,
ou un analogue de cette dernière à séquence apparentée. Cette enzyme
porte la référence SWISS-PROT «P08515, GT26 SCHJA», la séquence
polypeptidique va des positions 1 à 218 de la séquence SEQ ID N°1, et
est celle qui est utilisée dans un exemple de travail ci-après (voir ci-
dessous).

En conséquence, dans une forme de réalisation de l'invention, la
séquence polypeptidique supplémentaire capable de stabiliser la MT
est une enzyme présentant une activité de GST, choisie dans
l'ensemble comprenant :

- (a) un polypeptide comprenant une séquence d'acides aminés
telle que ressortant des positions 1 à 218 de la séquence SEC ID N°1 ;
- (b) un analogue du polypeptide défini en (a), qui a une homologie
d'au moins 70 % avec ledit peptide ; et
- (c) un fragment de (a) ou (b).

En relation avec ce qui précède, un autre aspect de l'invention

concerne un polypeptide de fusion isolé comprenant (i) un polypeptide de protéine métallothionéine (MT) comprenant un groupement prosthétique à ion Zn lié fusionné à (ii) une séquence polypeptidique de l'enzyme GST choisie dans le groupe consistant en :

- (a) un polypeptide comprenant une séquence d'acides aminés telle que ressortant des positions 1 à 218 de la séquence SEC ID N°1 ;
- (b) un analogue du polypeptide défini en (a), qui a une homologie d'au moins 70 % avec ledit peptide ; et
- (c) un fragment de (a) ou (b).

En outre, il est préférable que la MT soit une MT de la classe I, de préférence de la classe I humaine, et en particulier la MT de la classe I humaine MT-II ou un analogue à séquence apparentée. La référence SWISS-PROT correspondante est «nom d'entrée MT2 HUMAN ; N° d'accès primaire P02795», la séquence polypeptidique est présentée de la position 1 à la position 61 de la séquence SEQ ID N°2, et elle est utilisée dans un exemple de travail de l'invention (voir ci-dessous). La MT-II humaine peut aussi être appelée MT-IIA humaine.

En conséquence, dans une forme de réalisation de l'invention, le polypeptide de la protéine MT est choisi dans le groupe consistant en:

- (a) un polypeptide comprenant une séquence d'acides aminés telle que présentée sur les positions 1 à 61 de la séquence SEQ ID N°2 ;
- (b) un analogue du polypeptide défini en (a) qui présente une identité d'au moins 70 % avec ledit polypeptide ; et
- (c) un fragment de (a) ou (b).

Dans un exemple de travail de l'invention (voir ci-dessous), on produit un polypeptide de fusion comprenant la MT-II humaine ayant la séquence SEQ ID N°2 et la GST de la séquence SEQ ID N°1.

En conséquence, l'invention concerne un polypeptide de fusion isolé comprenant (i) un polypeptide de protéine métallothionéine MT comprenant un groupement prosthétique à ion Zn lié choisi dans le groupe consistant en :

- (a) un polypeptide comprenant une séquence d'acides aminés telle que présentée sur les positions 1 à 61 de la séquence SEQ ID N°2 ;
- (b) un analogue du polypeptide défini en (a) qui présente une identité d'au moins 70 % avec ledit polypeptide ; et

(c) un fragment de (a) ou (b) ;

fusionné à (ii) une séquence polypeptidique d'enzyme GST choisie dans le groupe consistant en :

5 (a) un polypeptide comprenant une séquence d'acides aminés telle que ressortant des positions 1 à 218 de la séquence SEC ID N° 1 ;

(b) un analogue du polypeptide défini en (a), qui a une homologie d'au moins 70 % avec ledit peptide ; et

(c) un fragment de (a) ou (b).

10 L'identité du polypeptide dont il est question ci-dessus est déterminée par le degré d'identité entre deux séquences, ce qui indique que la première séquence dérive de la seconde. L'identité peut être avantageusement déterminée à l'aide de programmes informatiques connus dans la technique, tels que le GAP (disponible dans le progiciel GCG (Program Manual for the Wisconsin Package, version 8, Août
15 1994, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711) (Needleman SB et Wunsch, CD (1970), Journal of Molecular Biology 48, 443-453).

EXEMPLES

Méthode générale de biologie moléculaire :

20 Sauf mention contraire, les manipulations et transformations de l'ADN sont réalisées par utilisation de techniques classiques de la biologie moléculaire (Sambrook et al. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor lab., Cold Spring Harbor, NY ; Ausubel, F.M. et al. (eds) : "Current protocols in Molecular Biology",
25 John Wiley ADN Sons, 1995 ; Harwood, C.R. et Cutting S.M. (eds).

Les enzymes pour les manipulations de l'ADN sont utilisées selon les recommandations des fournisseurs.

Enzymes pour manipulations d'ADN

30 Sauf mention contraire, toutes les enzymes destinées à des manipulations de l'ADN, telles par exemple que les endonucléases de restriction, les ligases, les polymérases pour PCR, etc., sont obtenues auprès de New England Biolabs, Inc.

Exemple 1

35 Synthèse d'un plasmide comprenant une séquence codant pour la métallothionéine-IIA humaine fusionnée à un peptide de glutathion-S-transférase pour obtenir un produit de fusion «MT-IIA-GST» :

On obtient l'ADNc de la MT-IIA humaine par transcription

inverse d'un ARNm pouvant être obtenu d'après Karin & Richards ; Nature 299:797-802 (1982), et aimablement fournis par eux (Department of Genetics, Australian National University). La séquence d'acides aminés de la MT-IIA humaine est présentée entre les positions 1 et 61 de la séquence SEQ ID N°2. L'ADNc de la MT-IIA est cloné dans le plasmide pUC13 (qui possède une origine de réplication de E. coli), en étant inséré entre les sites HindIII et BamHI à l'intérieur de son lieu multsites.

La MT-IIA est clonée dans le vecteur d'expression pGEX-4T1 (pour la séquence complète, voir le numéro d'identification Genbank «XXU13853»). Le vecteur pGEX-4T1 comprend le promoteur tac inductible par l'IPTG, le gène de résistance à l'ampicilline et un lieu multsites pour cloner des gènes dans le cadre de lecture de l'extrémité 3' du gène codant pour l'enzyme glutathion-S-transférase (GST) de *Shistosoma japonicum*. Ledit gène de la GST comprend la séquence polypeptidique allant des positions 1 à 218 de la séquence SEQ ID N°1. Le polypeptide de fusion ainsi obtenu possède la GST en tant que partie N-terminale, la mT-IIA en tant que partie C-terminale, avec fusion par une séquence polypeptidique comprenant un site de clivage par le facteur X_a.

Dans le cas présent, les étapes sont les suivantes :

1. Amplification PCR de l'ADNc de la mT-IIA et introduction de sites appropriés de restriction par l'intermédiaire d'amorces pour PCR.

2. Purification du fragment PCR.

3. Digestion du fragment PCT et du vecteur de clonage.

4. Transformation.

5. Détection des clones transformés.

6. Séquençage.

La matrice d'ADN servant à la réaction PCR est un mini-prep plasmidique de la MT-IIA, cloné dans le pUC13. Les oligonucléotides (amorces pour PCR) utilisés sont préparés par Amersham-Pharmacia Biotech. Ces séquences sont spécifiques de la MT-IIA et introduisent les sites de restriction BamHI-SalI pendant l'amplification PCR. La réaction PCR est réalisée sous forme d'une réaction «Hot Start» à départ chaud.

Le fragment PCR obtenu est purifié par électrophorèse sur gel (agarose à 1 %) et est digéré par les enzymes de restriction BamHI et

Sall. Le vecteur pGEX-4T1 est digéré par ces mêmes enzymes. Le fragment PCR est ligaturé dans le vecteur, transformé en cellules compétentes de *E. coli* DH5a, et les clones positifs (c'est-à-dire comprenant le gène de la MT-IIA) sont vérifiés par une carte de digestion par des enzymes de restriction. Finalement, on vérifie par séquençage d'ADN la séquence du gène de la MT-IIA d'un clone positif (ayant un plasmide pGEX-4T1-MT-IIA).

Exemple 2

Expression et purification par recombinaison du produit de fusion «MT-IIA-GST» de l'exemple 1

On utilise un fermenteur automatique Biostat U (Braun Biotech), qui est couplé à un système de récupération de masse cellulaire automatique, Westfalia Separator (Braun Biotech). Ce dernier possède une centrifugeuse (modèle CSA-1-06-475) commandée par un programme (TVE-OP 76/0).

La fermentation est effectuée comme suit :

1. Incubation jusqu'au lendemain, dans un milieu LB avec ampicilline à 37°C, d'un clone de *E. coli* comprenant un plasmide pGEX-4T1-MT-2A ;

2. Ensemencement, par cette culture, d'un nouveau milieu LB avec ampicilline ;

3. Croissance jusqu'à une densité d'environ 10^8 cellules par millilitre de milieu à 37°C ;

4. Induction par IPTG ;

5. Addition de $ZnCl_2$;

6. Incubation pendant 3 heures, calculées à partir du moment de l'induction ;

7. Interruption de la croissance de la culture et récupération de la masse cellulaire ;

8. Centrifugation à 7700 g pendant 10 minutes pour éliminer le reste du milieu de culture cellulaire et récupération de la masse cellulaire, qui est utilisée pour purifier la protéine MT-IIA-GST.

Pour la purification de l'extrait protéique obtenue après sonication de la masse cellulaire récupérée, on utilise une matrice inerte de sépharose 4B. On lie à la matrice des molécules de glutathion, ce qui donne une matrice de gel d'affinité (c'est-à-dire que la GST (et donc la MT-IIA-GST) se lie au glutathion). L'extrait protéique

est appliqué sur une colonne comprenant cette matrice d'affinité, et on élue ensuite le produit de fusion MT-IIA-GST.

La pureté et l'entièreté du composé MT-IIA-GST sont analysées par électrophorèse sur gel de SDS-acrylamide, la coloration utilisant du bleu de Coomassie ou une coloration à l'argent. Une seule bande est identifiée, c'est-à-dire qu'il n'y a aucune contamination importante, et les dimensions de la bande sont celles qui sont prévues quand on les compare à celles d'un étalon de masse moléculaire.

La quantification du produit MT-IIA-GST est effectuée par la méthode calorimétrique de Bradford, à l'aide d'une analyse de protéine Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad).

On procède à une confirmation de la fonctionnalité de la coordination métallique par spectrométrie d'émission par plasma à couplage inductif (ICPAES), qui montre que les métaux sont liés à la MT-IIA à l'intérieur du produit de fusion MT-IIA-GST.

Exemple 3 :

Exemples de compositions cosmétiques dans lesquelles on a incorporé un produit MT-IIA-GST de l'exemple 2

Tous les chiffres sont des pourcentages en poids par rapport à la composition.

Gel pour le bain

Eau	qsp 100
Laurylsulfate de sodium éthoxylé à 28 %	55,0
Conservateur	0,05
PEG-4, (alkyle gras dérivé de l'huile de colza)-amide	0,3
(Alkyle gras dérivé de l'huile de copra) amide-propylbétaine à 30 %	16,0
PEG-7 sel de glycéryle de l'acide gras dérivé de l'huile de copra	1,0
MT-IIA-GST	0,00001
Parfum	0,5
Triéthanolamine à 99 %	0,06
CI 16035	0,04
CI 19140	0,2
Chlorure de sodium	0,15

Savon liquide

	Eau	qsp 100
	Hydroxypropylguar-chlorure d'hydroxypropyl-trimonium	0,2
5	Acide citrique	0,03
	TAE-lauryl sulfate à 40 %	30,0
	Conservateur	0,5
	(Alkyle gras dérivé de l'huile de copra) amide-propylbétaine à 30 %	8,0
10	Diméthicon copolyol	0,5
	PEG-7 sel de glycéryle de l'acide gras dérivé de l'huile de copra	0,5
	Décyl-polyglucose à 50 %	2,0
	Parfum	0,4
15	MT-IIA-GST	0,00001

Shampoing

	Eau	qsp 100
	Conservateur	0,5
20	(Alkyle gras dérivé de l'huile de copra)-amide-propylbétaine à 30 %	4,0
	(Alkyle gras dérivé de l'huile de copra)-amide-oxyde de propylamine à 30 %	5,0
	Laurylsulfosuccinate de sodium éthoxylé à 30 %	17,0
25	(Alkyle gras dérivé de l'huile de copra)-amide MEA	1,3
	(Oléfine en C14-16)-sulfonate de sodium à 37 %	12,0
	Eau	15,0
	Acide lactique	0,1
30	Chlorure de sodium	0,5
	Parfum	0,5
	MT-IIA-GST	0,00001

Shampoing conditionnant :

35	Hydroxypropylguar-chlorure d'hydroxypropyl-Trimonium	0,1
	Eau	qsp 100
	Acide lactique	0,2

	Laurylsulfate de sodium éthoxylé à 27 %	32,0
	Conservateur	0,5
	Polyquaternium-39	1,5
5	(Alkyle gras dérivé de l'huile de copra)- amide-propylbétaine à 30 %	6,0
	Oxyde de stéaramine à 25 %	1,5
	Décylpolyglucose à 50 %	5,0
10	Distéarate de glycol (20 % ; LESS (5 %) ; (alkyle gras dérivé de l'huile de copra) amide DEA (10 %)	2,0
	PEG-55 oléate de propylèneglycol à 50 %	0,8
	MT-IIA-GST	0,00001
	Parfum	0,3
15	Copolymère styrène/acrylate	0,5
	Eau	3,0
	Chlorure de sodium	0,7
	CI 19140	0,07
	<u>Tonique capillaire</u>	
	Eau	qsp 100
20	Alcool dénaturé	30,0
	Copolymère PVP/VA	2,5
	Conservateur	0,2
	PEG-40 huile de ricin hydrogénée	0,5
	Parfum	0,1
25	Triéthanolamine à 50 %	0,02
	MT-IIA-GST	0,0001
	CI 16225 ; CI 47005 ; CI 42051	0,06
	CI 19140	0,01
	<u>Baume après rasage</u>	
30	Eau	qsp 100
	Copolymère réticulé acrylates/acrylate d'alkyle en C10-30	0,3
	Glycérol	2,0
	Aloé barbadensis	8,0
35	Triéthanolamine à 99 %	0,15
	Eau	0,15
	Alcool dénaturé	10,0

	Menthol	0,2
	BHT	0,05
	Conservateur	0,5
	PPG-15 stéaryléther	3,0
5	Parfum	1,25
	Bisabolol	0,1
	MT-IIA-GST	0,0001
	EDTA disodique	0,1
	<u>Lotion de bronzage SPF 20</u>	
10	Stéarate de PEG 50%; stéarate de glycéryle 50%	6,0
	Vaseline	0,5
	Alcool cétylique	2,5
	Paraffine liquide	9,0
	Méthoxycinnamate d'octyle	9,0
15	Benzophénone-3	3,5
	Triticum vulgare	1,5
	BHT	0,1
	Eau	qsp 100
	Propylèneglycol	2,0
20	Conservateur	0,7
	Parfum	0,3
	MT-IIA-GST	0,0001
	Dioxyde de titane	3,0
	<u>Lotion de bronzage (protection moyenne)</u>	
25	Stéarate de glycéryle ; cétét h-20	3,0
	Alcool stéarylique ; stéareth 7 ; stéareth 10	2,5
	Alcool cétylique	1,0
	Triglycéride caprylique/caprique	4,0
	BHT	0,1
30	Triticum vulgare	3,0
	Benzophénone-3	1,0
	Paraffine liquide	7,0
	Methoxycinnamate d'octyle	4,0
	Eau	qsp 100
35	Parfum	0,35
	Conservateur	0,7
	MT-IIA-GST	0,0001

Tonique pour le visage

	Eau	qsp 100
	Rosa canine	15,0
	Conservateur	0,5
5	Propylèneglycol	2,5
	MT-IIA-GST	0,00001
	Parfum	0,1
	PEG-40 huile de ricin hydrogénée	0,6
	CI 16035	qs

10 Lotion humectante

	Stéareth-2	2,4
	Stéareth-21	1,6
	PEG-15 stéaryléther	4,0
	Paraffine liquide	3,0
15	Conservateur	0,6
	Alcool cétylique	3,0
	Benzophénone-3	0,5
	Triticum vulgare	1,0
	BHT	0,1
20	Cire blanche	1,0
	Propylèneglycol	2,5
	Eau	qsp 100
	Dimethicon copolyol	2,0
	Parfum	0,4
25	MT-IIA-GST	0,0001

Gel-crème

	Glycérol	2,5
	Eau	qsp 100

30	Copolymère réticulé acrylates/acrylate d'alkyle en C10-30	0,4
	Carbomère	0,35
	Conservateur	0,5
	BHT	0,1
35	Sel d'octyle de l'acide gras dérivé de l'huile de copra	6,0
	Diméthicon copolyol	1,0
	Triglycéride caprylique/caprique	3,0

	Triticum vulgare	
	Parfum	3,0
	Triéthanolamine à 99 %	0,2
	MT6IIA-GST	0,65
5	<u>Crème de maquillage</u>	0,00001
	Cétyl-diméthicon-copolyol	2,0
	Oléate de polyglycérile-3	0,75
	Cétyl-diméthicon	2,0
	Palmitate d'octyle	3,0
10	Huile de ricin hydrogénée	0,4
	Cire d'abeille	0,8
	Oléate de décyle	1,0
	Diméthicon 350 cSt	0,25
	Stéarate d'octyle	3,0
15	Cyclométhicon	15,0
	Oxydes de fer bruns	0,3
	Dioxyde de titane rouge, jaune, noir	2,10
	Eau	qsp 100
	Chlorure de sodium	0,5
20	Propylèneglycol	2,0
	MT-IIA-GST	0,00001
	<u>Eau atomique (tonique pour la peau)</u>	
	Eau	qsp 100
25	Copolymère réticulé acrylates/acrylate d'alkyle en C10-30	0,05
	Conservateur	0,05
	Quaternium-15	0,05
	Parfum	0,2
30	PEG-40 huile de ricin hydrogénée	1,1
	Eau	1,0
	MT-IIA-GST	0,00001
	Diméthicon copolyol	0,4
	Triéthanolamine à 99 %	0,75

LISTE DES SEQUENCES

<110> Provital S.A.

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> SEQ ID NO 1

<211> 218

<212> PRT

<213> GST de Schistosoma japonicum

<400>

Met Ser Pro Ile Leu Gly Tyr Trp Lys Ile Lys Gly Leu Val Gln Pro
 1 5 10 15

Thr Arg Leu Leu Leu Glu Tyr Leu Glu Glu Lys Tyr Glu Glu His Leu
 20 25 30

Tyr Glu Arg Asp Glu Gly Asp Lys Trp Arg Asn Lys Lys Phe Glu Leu
 35 40 45

Gly Leu Glu Phe Pro Asn Leu Pro Tyr Tyr Ile Asp Gly Asp Val Lys
 50 55 60

Leu Thr Gln Ser Met Ala Ile Ile Arg Tyr Ile Ala Asp Lys His Asn
 65 70 75 80

Met Leu Gly Gly Cys Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ile Ser Met Leu Glu
 85 90 95

Gly Ala Val Leu Asp Ile Arg Tyr Gly Val Ser Arg Ile Ala Tyr Ser
 100 105 110

Lys Asp Phe Glu Thr Leu Lys Val Asp Phe Leu Ser Lys Leu Pro Glu
 115 120 125

Met Leu Lys Met Phe Glu Asp Arg Leu Cys His Lys Thr Tyr Leu Asn
 130 135 140

Gly Asp His Val Thr His Pro Asp Phe Met Leu Tyr Asp Ala Leu Asp
 145 150 155 160

Val Val Leu Tyr Met Asp Pro Met Cys Leu Asp Ala Phe Pro Lys Leu
 165 170 175

5

Val Cys Phe Lys Lys Arg Ile Glu Ala Ile Pro Gln Ile Asp Lys Tyr
 180 185 190

Leu Lys Ser Ser Lys Tyr Ile Ala Trp Pro Leu Gln Gly Trp Gln Ala
 195 200 205

10

Thr Phe Gly Gly Gly Asp His Pro Pro Lys
 210 215

15

<210> SEQ ID NO 2
 <211> 61
 <212> PRT
 <213> MT-II humaine

20

<400> 2

Met Asp Pro Asn Cys Ser Cys Ala Ala Gly Asp Ser Cys Thr Cys Ala
 1 5 10 15

25

Gly Ser Cys Lys Cys Lys Glu Cys Lys Cys Thr Ser Cys Lys Lys Ser
 20 25 30

Cys Cys Ser Cys Cys Pro Val Gly Cys Ala Lys Cys Ala Gln Gly Cys
 35 40 45

30

Ile Cys Lys Gly Ala Ser Asp Lys Cys Ser Cys Cys Ala
 50 55 60

35

REVENDICATIONS

1. Composition cosmétique et/ou pharmaceutique sous forme d'un gel, d'une crème, d'un onguent, d'un savon ou d'une lotion corporelle, pour la protection externe des tissus humains ou animaux
5 (a) contre un contact par des métaux lourds et/ou (b) contre un rayonnement ultraviolet, caractérisée en ce qu'elle comprend des protéines métallothionéines (MT), où la majorité des protéines MT comprennent un groupement prosthétique à ion Zn lié, et caractérisée en ce qu'elle peut être obtenue par un procédé comprenant les étapes
10 suivantes :

(a) construction, par des techniques de recombinaison d'ADN, d'une cellule de production comprenant un produit de synthèse d'ADN qui comprend une séquence d'ADN codant pour une MT présentant un intérêt et qui est capable de produire la MT ;

15 (b) culture de la cellule de production dans un milieu approprié, pendant un laps de temps approprié, dans des conditions appropriées, dans lesquelles la cellule produit la MT, et où le milieu comprend des ions Zn en une quantité molaire suffisante pour garantir que la majorité des protéines MT produites vont comprendre un groupement prosthétique à ion Zn lié, et que le milieu ne comprend essentiellement
20 pas d'ions Pb, Cd, Cu, Ag, Hg ou Bi ;

(c) isolement des protéines MT produites, la majorité des protéines MT comprenant un groupe protétique à ion Zn lié.

2. Composition cosmétique et/ou pharmaceutique selon la
25 revendication 1, caractérisée en ce que le produit de synthèse d'ADN de l'étape (a) n'est capable que de transcrire la séquence d'ADN codant pour la MT après une induction appropriée, les ions zinc étant ensuite ajoutés au milieu avant ou immédiatement après induction du produit de synthèse d'ADN pour transcription de la séquence d'ADN.

30 3. Composition cosmétique et/ou pharmaceutique selon les revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que la séquence d'ADN codant pour la MT est sous le contrôle d'un promoteur tac, inductible par l'IPTG, l'induction étant effectuée par addition d'IPTG au milieu.

35 4. Composition cosmétique et/ou pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que la cellule de production est une cellule de E. coli, et l'isolement de la MT produite est effectué par séparation des cellules de E. coli du milieu,

suivie d'une lyse des cellules et d'un isolement des protéines MT comprises à l'intérieur du lysat cellulaire.

5 5. Composition cosmétique et/ou pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que le produit de synthèse d'ADN de l'étape A de la revendication 1 comprend une séquence d'ADN codant pour un polypeptide de fusion de la MT et une séquence polypeptidique supplémentaire capable de stabiliser la MT pendant l'étape de culture B de la revendication 1.

10 6. Composition cosmétique et/ou pharmaceutique selon la revendication 5, caractérisée en ce que la séquence polypeptidique supplémentaire est capable de stabiliser la métallothionéine sous sa forme aprotéine.

15 7. Composition cosmétique et/ou pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 5 ou 6, caractérisée en ce que la séquence polypeptidique supplémentaire stabilise la MT du fait qu'elle est capable de diminuer la vitesse d'oxydation des groupes thiol (-SH) de la cystéine de la MT, ce qui diminue la formation des ponts disulfure à l'intérieur de la MT.

20 8. Composition cosmétique et/ou pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 5 à 7, caractérisée en ce que le polypeptide supplémentaire fusionné à la MT est éliminé de la MT après l'étape d'isolement (c) de la revendication 1.

25 9. Composition cosmétique et/ou pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 5 à 7, caractérisée en ce que le polypeptide supplémentaire fusionné à la MT est de même capable de stabiliser la MT isolée finale de telle sorte que le polypeptide de fusion comprenant le polypeptide stabilisant supplémentaire soit plus stable que la MT correspondante sans le polypeptide stabilisant supplémentaire.

30 10. Composition cosmétique et/ou pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 5 à 9, caractérisée en ce que la MT est fusionnée à la séquence polypeptidique supplémentaire capable de stabilisation de telle sorte que le polypeptide de fusion possède le polypeptide supplémentaire au niveau du site N-terminal et la MT au niveau site C-terminal du produit de fusion.

35 11. Composition cosmétique et/ou pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 5 à 10, caractérisée en ce que la

séquence polypeptidique supplémentaire capable de stabiliser la MT comprend une séquence de l'enzyme glutathion-S-transférase (GST), de préférence d'une enzyme GST de *Schistosoma japonicum*.

5 12. Composition cosmétique et/ou pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisée en ce la MT est une MT de la classe I, de préférence une MT de la classe I humaine et en particulier la MT de la classe I humaine MT-II A.

10 13. Composition cosmétique et/ou pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre un excipient inerte d'un point de vue physiologique convenant à une administration topique.

15 14. Composition cosmétique et/ou pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, caractérisée en ce que la composition comprend de 0,0000001 à 10 % (en poids) du polypeptide MT, de préférence de 0,000001 à 5 % (en poids) du polypeptide MT, encore plus préféablement de 0,0000005 à 1 % (en poids) du polypeptide MT et de façon encore plus préférée de 0,000005 à 0,0005 % en poids du polypeptide MT.

20 15. Composition cosmétique et/ou pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, caractérisée en ce que la composition est un gel pour le bain, un savon liquide, un shampoing, un shampoing conditionnant, un tonique capillaire, un baume après rasage, une lotion de bronzage (de préférence de protection moyenne), un tonique pour le visage, une lotion humectante, un gel-crème, une
25 crème de maquillage, une fond de teint ou un tonique pour la peau.

30 16. Utilisation de la composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 15, pour la protection cosmétique externe de tissus humains ou animaux contre (a) un contact par un métal lourd et/ou (b) un rayonnement par une lumière ultraviolette, par administration topique de la composition sur les tissus.